

М. Л. Пивовар, В. М. Ёршик, В. И. Фадеев, А. И. Жебентяев

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕРЕОИЗОМЕРОВ ИБУПРОФЕНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ**Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет**

Предложена методика определения стереоизомеров ибупрофена в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением спектрофотометрического детектора. В процессе пробоподготовки ибупрофен с внутренним стандартом (напроксеном) экстрагируют смесью циклогексан-изопропанол (95:5 об/об). Исследуемые вещества элюируют смесью 0,1 М фосфатный буферный раствор (рН 7,0) и метанол (95:5 об/об). Расход подвижной фазы составляет 0,9 мл/мин. Детектирование осуществляют при длине волны 214 нм. Концентрацию ибупрофена рассчитывают по градуировочным графикам, линейным в диапазонах концентраций 0,26–26,0 мкг/мл.

Ключевые слова: ибупрофен, стереоизомеры, ВЭЖХ, плазма крови, количественное определение.

ВВЕДЕНИЕ

Ибупрофен является представителем группы производных пропионовой кислоты. Относится к фармакотерапевтической группе нестероидных противовоспалительных средств (НПВС). Обладает противовоспалительной, анальгетической и умеренной жаропонижающей активностью.

Ибупрофен хорошо абсорбируется из желудка. После абсорбции около 60% фармакологически неактивной *R*-формы ибупрофена медленно трансформируется в активную *S*-форму. Максимальная концентрация ибупрофена в плазме составляет приблизительно 30 мкг/мл и достигается примерно через 2 часа после приема лекарственного средства в дозе 400 мг. Ибупрофен более чем на 99% связывается с белками крови, в основном с альбуминами [1].

Структурные формулы *R*- и *S*-форм ибупрофена представлены на рисунке 1.

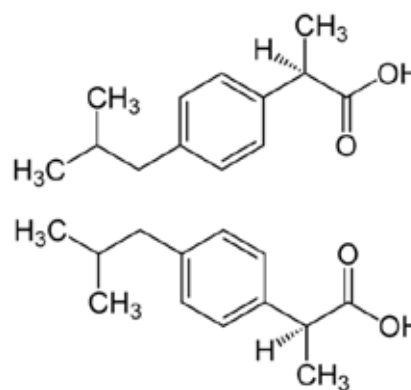
Ибупрофен представляет собой белый кристаллический порошок, практически не растворимый в воде, растворимый в этаноле, хлороформе и эфире. Показатель константы кислотности (pK_a) ибупрофена равен 4,4; логарифм константы распределения ($\log P$) – 4,0 [2].

Для выделения ибупрофена из плазмы крови авторы [3] использовали метод твердофазной экстракции. Элюаты хроматографировали на колонках Chiral AGP- α 1 с использованием подвижной фазы фосфатный буферный раствор (рН 7,0) - изопропа-

нол 98:2, скорость подачи подвижной фазы 0,9 мл/мин. Детектирование осуществляли спектрофотометрически при длине волны 225 нм. В качестве внутреннего стандарта использовали напроксен.

Для выделения ибупрофена из плазмы крови использовали также жидкость-жидкостную экстракцию. Например, в работе [4] предложено использовать в качестве экстрагента смесь гексан-изопропиловый спирт (95:5) в присутствии 1 М хлороводородной кислоты (внутренний стандарт – напроксен). Хроматографический анализ выполняли на аналитической колонке Chromsil-100-5CH1-TBV с подвижной фазой гексан - метил-трет-бутиловый эфир – изопропанол (88:12:1,5) со скоростью 1 мл/мин, детектирование спектрофотометрическое при длине волны 220 нм.

Близкая методика пробоподготовки описана авторами [5], которые использовали экстракцию циклогексаном в при-

Рисунок 1 – *R*- и *S*- ибупрофен

сутствии 3 М хлороводородной кислоты (без внутреннего стандарта). Разделение стереоизомеров выполняли на колонке Chiral AGP- α 1 с использованием подвижной фазы следующего состава: 990 мл фосфатного буферного раствора (pH = 6,9), 10 мл ацетонитрила и 204 мкл N,N-диметилоктиламина. Спектрофотометрическое детектирование осуществляли при длине волны 220 нм.

Цель работы – разработать методику количественного определения *R*- и *S*-ибупрофена в плазме крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали рабочие стандартные образцы ибупрофена и напроксена (внутренний стандарт).

Исследования проводили на жидкостном хроматографе Agilent HP 1100, оснащенном диодноматричным детектором. Хроматографическая колонка – Chiral AGP- α 1 (100×4 мм, 5 мкм), температура колонки 20 °С. В качестве подвижной фазы использовали 0,1 М фосфатный буферный раствор pH 7,0 – метанол (95:5 об/об). Расход элюента 0,9 мл/мин. Аналитическая длина волны 214 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для пробоподготовки нами выбран метод жидкость-жидкостной экстракции, так как он обладает невысокой трудоемкостью и позволяет проводить пробоподготовку одновременно большого количества проб. Использование в качестве экстрагента неполярного циклогексана позволяет получить пробы, содержащие незначительное количество компонентов матрицы. Добавка 5% изопропанола обеспечивает высокую степень извлечения аналита.

В качестве внутреннего стандарта выбран напроксен [3–5]. Экстракция осуществляется после прибавления 100 мкл 1 М цитратного буферного раствора (pH = 2,5), так как при меньшем значении pH при экстракции образуется устойчивая эмульсия, а при большем значении pH снижается степень извлечения аналита и внутреннего стандарта.

При подборе условий хроматографического разделения нами были исследованы все варианты подвижной фазы, рекомендуемые в паспорте на хроматографическую

колонку. Наилучшее разделение стереоизомеров ибупрофена с компонентами матрицы наблюдали при использовании в качестве подвижной фазы смеси 0,1 М буферный раствор pH 7,0 – метанол (95:5 об/об).

Разработанная методика количественного определения включает в себя следующие операции. В экстракционные пробирки помещают по 1,0 мл плазмы крови, 100 мкл 1 М цитратного буферного раствора с pH = 2,5, 100 мкл метанольного раствора внутреннего стандарта (напроксен 25 мкг/мл) и 3,0 мл смеси циклогексан-изопропанол (95:5 об/об). Содержимое пробирок перемешивают в течение 5 минут, затем центрифугируют в течение 10 минут. По 2,0 мл органической фазы переносят в полипропиленовые пробирки и упаривают в токе воздуха при температуре 25–30 °С. Сухой остаток растворяют в 0,5 мл смеси 0,1 М фосфатный буферный раствор pH 7,0 – метанол (9:1 об/об) путем встряхивания на вортекс-шейкере в течение 10 минут. После центрифугирования при 7000 об/мин раствор из пробирок переносят в вials для хроматографа и хроматографируют.

Содержание *R*- и *S*-ибупрофена рассчитывали по графику зависимости аналитического сигнала от концентрации *S*-ибупрофена в модельных образцах плазмы крови, что согласуется с литературными данными [3].

Методику валидировали в соответствии с требованиями [6] для диапазона определяемых содержаний примерно 0,25–25 мкг/мл [3].

Методика обладает удовлетворительной специфичностью: на хроматограммах различных образцов плазмы, не содержащих аналита, не обнаружено хроматографических пиков со временами удерживания, соответствующих временам удерживания хроматографических пиков *R*-ибупрофена, *S*-ибупрофена и напроксена (с соотношением сигнал/шум более 3). Типичная хроматограмма подготовленного образца плазмы крови, содержащей ибупрофен, представлена на рисунке 2.

Для исследования правильности и воспроизводимости методики анализировали в различные дни модельные растворы плазмы, содержащие различные концентрации ибупрофена из предполагаемого диапазона определяемых содержаний. Результаты представлены в таблице.

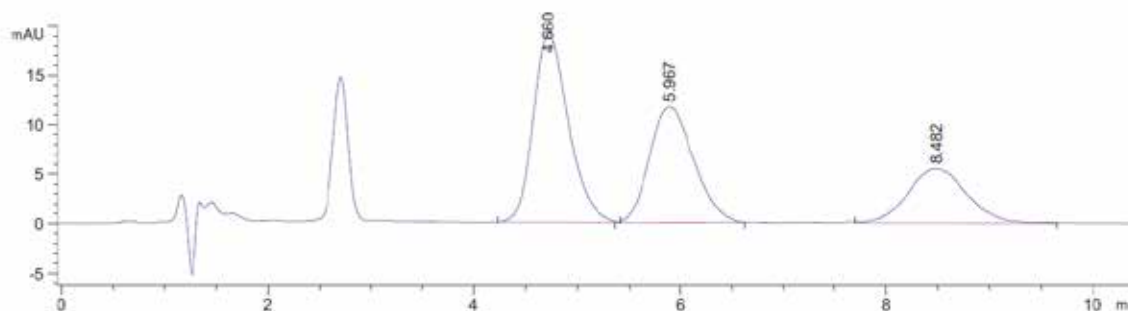


Рисунок 2 – Хроматограмма плазмы крови, содержащей *R*-ибупрофен (около 4,6 мин), *S*-ибупрофен (около 5,9 мин) и напроксен (около 8,4 мин)

Таблица – Результаты определения ибупрофена в модельных образцах плазмы в разные дни

| № | Найдено ибупрофена, мкг/мл | | | | | |
|-------------------|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | R | S | R | S | R | S |
| Введено: | 0,26 | 0,26 | 15,6 | 15,6 | 26,0 | 26,0 |
| 1 | 0,22 | 0,22 | 14,8 | 14,9 | 25,5 | 25,7 |
| 2 | 0,28 | 0,27 | 14,8 | 14,9 | 26,4 | 26,7 |
| 3 | 0,27 | 0,28 | 15,5 | 15,7 | 25,8 | 25,7 |
| 4 | 0,25 | 0,25 | 15,7 | 15,9 | 26,1 | 26,4 |
| 5 | 0,28 | 0,28 | 15,7 | 15,9 | 26,4 | 26,4 |
| 6 | 0,26 | 0,27 | 15,9 | 15,8 | 26,1 | 26,1 |
| 7 | 0,24 | 0,26 | 15,9 | 16,0 | 26,4 | 26,3 |
| Ср. зн., мкг/мл | 0,26 | 0,26 | 15,5 | 15,6 | 26,1 | 26,2 |
| R, % | 98,9 | 101,5 | 99,2 | 99,8 | 100,3 | 100,6 |
| $t_{\text{эксп}}$ | 0,331 | 0,470 | 0,664 | 0,185 | 0,639 | 1,171 |

Правильность (R, %) и воспроизводимость (RSD, %) результатов находились в пределах критериев приемлемости (85,0–115,0% и 0–15,0% соответственно). Не наблюдали статистически значимых отклонений от истинного значения определяемой величины ($t_{\text{эксп}} < t_{\text{кр}}$. ($f=8$, $P=0,95$)).

Относительное стандартное отклонение угловых коэффициентов градуировочных графиков для расчета содержания ибупрофена, полученных в различные дни, составляло 1,09 %.

Методика валидирована для предполагаемого, согласно литературным данным, диапазона определяемых содержаний ибупрофена 0,26–26,0 мкг/мл.

Исследуемые образцы плазмы выдерживают три цикла заморозки-разморозки. После пробоподготовки растворы устойчивы не менее 24 часов при хранении проб в автосамплере. После разморозки образцы плазмы стабильны не менее 1 часа. При хранении в жидком азоте образцы плазмы устойчивы не менее 1 месяца.

Разработанная методика использована при проведении биоэквивалентных испытаний лекарственного средства «Ибуфлекс 400», таблетки 400 мг, производства ООО «Рубикон», Республика Беларусь в сравнении с лекарственным средством «Миг 400», таблетки 400 мг, производства «Берлин-Хеми АГ / Менарини Групп», Германия.

ВЫВОДЫ

Предложена методика определения стереоизомеров ибупрофена в плазме крови методом ВЭЖХ. Все валидационные критерии, рекомендованные руководством по валидации биоаналитических методик, находились в пределах критериев приемлемости.

Разработанная методика позволяет провести испытания биоэквивалентности ибупрофена и обеспечить надежное количественное определение стереоизомеров лекарственного вещества в плазме крови человека.

SUMMARY

M. L. Pivavar, V. M. Yorshyk, V. I. Fadeev,
A. I. Zhebentyaev

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF STEREOISOMERS OF IBUPROFEN IN BLOOD PLASMA

A procedure for the quantification of ibuprofen in blood plasma by high-performance liquid chromatography with UV detector has been developed. Ibuprofen and internal standard (naproxen) were extracted twice with mixture of cyclohexane and isopropanol (95:5). The drugs were eluted with a mobile phase, contain 0,1 M phosphate buffer (pH = 7,0) and methanol (95:5 v/v; 0,9 ml/min) and detection at 214 nm. The calibration graph was linear over a concentration range of 0,26–26,0 mcg/ml.

Keywords: ibuprofen, stereoisomers, HPLC, blood plasma, quantitative determination.

ЛИТЕРАТУРА

1. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России: Справочник / М.: АстраФармСервис – 2006 г. – 1536 с.
2. Moffat, A. C. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals / A.C. Moffat. – Fourth Edition. – London: The

pharmaceutical press, 2011. – 2609 p.

3. Разработка и валидация методики стереоселективного определения S- и R-ибупрофена методом ВЭЖХ в сыворотке крови / И. В. Семак [и др.] // Материалы VIII съезда фармацевтических работников Республики Беларусь. – Витебск, 2010. – С. 258–262.

4. Chiral separation of ibuprofen and chiral pharmacokinetics in healthy Chinese volunteers / C. Zheng [et al.] // European journal of drug metabolism and pharmacokinetics. – 2008. – Vol. 33, №1. – P. 45–51.

5. Rationale and conditions for the requirement of chiral bioanalytical methods in bioequivalence studies / J. T. Juan [et al.] // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 2010. – Vol. 66. – P. 599–604.

6. Guidance for Industry. Bioanalytical Methods Validation. – 2001. – 21 p.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
УО «Витебский государственный
ордена Дружбы народов
медицинский университет»,
кафедра токсикологической и
аналитической химии,
тел. 8 (0212) 37-00-06,
Пивовар М. Л.

Поступила 03.12.2015 г.